

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

---

Untersuchungen über die Resistenz schnellwachsender atypischer  
Mykobakterien im Temperaturbereich der Kurzzeitpasteurisierung  
und über deren Vermehrung in Milch

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
Udo Claus  
Tierarzt aus Bad Hersfeld

Gießen 1972



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41545921\\_0063](https://archive.org/details/IA41545921_0063)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Th. Schliesser

---

**Untersuchungen über die Resistenz schnellwachsender atypischer  
Mykobakterien im Temperaturbereich der Kurzzeitpasteurisierung  
und über deren Vermehrung in Milch**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
**Udo Claus**  
Tierarzt aus Bad Hersfeld

Gießen 1972

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
in Gießen

---

Dekan: Prof. Dr. E. Weiss

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Schliesser

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 1972



# INHALTSVERZEICHNIS

---

|                                                                                    | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. <u>Einleitung</u>                                                               | 1     |
| 2. <u>Schrifttum</u>                                                               | 2     |
| 2.1. Atypische Mykobakterien                                                       | 2     |
| 2.2. Schnellwachsende atypische Mykobakterien                                      | 4     |
| 2.3. Das Vorkommen von schnellwachsenden atypischen Mykobakterien in Milch         | 5     |
| 2.3.1. Vorkommen in Rohmilch                                                       | 5     |
| 2.3.2. Vorkommen in pasteurisierter Milch                                          | 7     |
| 2.4. Nachweis von atypischen Mykobakterien bei Mastitiden                          | 8     |
| 2.5. Die Pasteurisierung der Milch                                                 | 10    |
| 2.5.1. Gesetzliche Grundlagen der Milchpasteurisierung                             | 10    |
| 2.5.2. Pasteurisierungsverfahren                                                   | 11    |
| 2.6. Zur Prüfung der Thermoresistenz von Mikroorganismen in Laboratoriumsversuchen | 12    |
| 3. <u>Eigene Untersuchungen</u>                                                    | 15    |
| 3.1. Material und Methodik                                                         | 15    |
| 3.1.1. Teststämme zur Untersuchung der Thermoresistenz                             | 15    |
| 3.1.2. Teststämme zur Untersuchung der Vermehrung in Milch                         | 15    |
| 3.1.3. Nährböden                                                                   | 16    |
| 3.1.4. Milch zur Untersuchung der Vermehrung von Mykobakterien                     | 16    |
| 3.1.5. Methodik zur Untersuchung der Thermoresistenz                               | 17    |
| 3.1.6. Untersuchung der Vermehrung in Milch                                        | 18    |
| 3.2. Ergebnisse                                                                    | 19    |
| 3.2.1. Untersuchung der Thermoresistenz bei 71°C                                   | 19    |
| 3.2.2. Untersuchung der Thermoresistenz bei 74°C                                   | 23    |

|                                                                         | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2.3. Untersuchung der Hitzeeresistenz von M.phlei bei 76, 78 und 80°C | 24    |
| 3.2.4. Untersuchungen über die Vermehrung von Mykobakterien in Milch    | 26    |
| 3.3. Besprechung der Ergebnisse                                         | 29    |
| 3.3.1. Untersuchungen der Thermoresistenz                               | 29    |
| 3.3.2. Vermehrung von Mykobakterien in Milch                            | 33    |
| 4. <u>Diskussion</u>                                                    | 37    |
| 5. <u>Zusammenfassung</u>                                               | 41    |
| 6. <u>Literaturverzeichnis</u>                                          | 45    |
| 7. <u>Lebenslauf</u>                                                    |       |

## 1. Einleitung

Die Tilgung der Rindertuberkulose hat die Gefahr der alimentären Ansteckung des Menschen durch Milch, die Tuberkuloseerreger enthält, beseitigt. Es war allerdings nicht zu erwarten, daß das Verschwinden von *Mycobacterium bovis* aus roher Milch gleichbedeutend war mit einem Verschwinden von Mykobakterien überhaupt. Die Tatsache, daß atypische schnellwachsende Mykobakterien gelegentlich als Ursache tuberkulöser Erkrankungen - sog. Mykobakteriosen - beim Menschen vorkommen, wirft zwangsweise die Frage nach der Herkunft dieser Keime auf. Daß solche, früher auch als saprophytäre Mykobakterien bezeichnete Keime in roher Milch häufig vorkommen können, ist schon eine altbekannte Tatsache (21, 34, 39, 41). In neuerer Zeit konnten diese Mykobakterien aber nicht nur in roher Milch (4, 12, 25, 58), sondern vereinzelt auch in pasteurisierter Milch gefunden werden (4, 13).

Die Frage, ob die in pasteurisierter Milch nachgewiesenen Keime den Pasteurisierungsprozeß überlebten oder ob sie nachträglich infolge Kontamination in die Milch gelangten, blieb dabei ungeklärt.

Als Beitrag zur Klärung dieser Frage wurde mir die Aufgabe gestellt, die Thermoresistenz schnellwachsender atypischer Mykobakterien im Temperaturbereich der heute üblichen Kurzzeitpasteurisierung zu untersuchen und zu klären, ob und in welchem Umfang diese Keimarten in der Lage sind, sich in Milch zu vermehren.

## 2. Schrifttum

### 2.1. Atypische Mykobakterien

Die sog. atypischen Mykobakterien gehören alle zur Gattung *Mycobacterium*. Sie sind aber nicht atypisch als Mykobakterien, sondern atypisch als Erreger von Erkrankungen, für deren Entstehung man seit Robert KOCH praktisch allein die klassischen Erreger der Tuberkulose verantwortlich gemacht hat (45). Die heutige Einteilung der atypischen Mykobakterien stützt sich immer noch auf die ursprünglichen vier Gruppen nach RUNYON, der seinerzeit die Farbstoffbildung und die Wachstumsgeschwindigkeit als Einteilungskriterien verwendet hat (43):

GRUPPE I: Photochromogene Mykobakterien mit durch kurze Belichtung induzierbarer Bildung eines gelben Pigmentes, langsam wachsend

GRUPPE II: Skotochromogene Mykobakterien mit Bildung eines gelben bzw. gelb-orangen Pigmentes, sowohl in der Dunkelheit als auch unter Lichteinwirkung, langsam wachsend

GRUPPE III: Nichtchromogene Mykobakterien, also fehlende Pigmentbildung, langsam wachsend

GRUPPE IV: Schnellwachsende Mykobakterien, deren Kolonien teils pigmentiert, teils nicht pigmentiert sind

Die Mykobakterienarten, die heute zu diesen 4 Gruppen gerechnet werden, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die RUNYON'sche Einteilung ist unter rein humanmedizinischen Gesichtspunkten vorgenommen worden und ist deshalb für die Veterinärmedizin problematisch. Unbefriedigend ist vor allem der Umstand, daß der Gruppe III auch *M. avium* zugeordnet wird, ein Keim, der in der Veterinärmedizin als klassischer Tuberkuloseerreger gelten muß. Das Schema nach RUNYON ist aber international bewährt und bildet eine gemeinsame Basis für die vergleichende Betrachtung der Rolle dieser Bakterien bei Mensch und Tier (46).

TABELLE 1: Atypische Mykobakterien (nach MEISSNER 1970)

| Gruppe<br>(nach RUNYON) | Charakterist.<br>Merkmal | Species bzw.<br>Varianten                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I                       | photochromogen           | <i>M. kansasii</i><br><i>M. marinum</i><br><i>M. ulcerans</i><br><i>M. gastri</i>                                                                                                                                                                      |
| II                      | scotochromogen           | <i>M. aquae</i><br><i>M. aquae var. ureolytic.</i><br><i>M. scrofulaceum</i><br><i>M. flavescens</i>                                                                                                                                                   |
| III                     | nicht<br>photochromogen  | <i>M. avium</i><br><i>M. intracellulare</i><br><i>M. xenopi</i><br><i>M. terrae</i><br><i>M. novum</i><br><i>M. triviale</i>                                                                                                                           |
| IV                      | schnell wachsend         | <i>M. aurum</i><br><i>M. borstelense</i><br><i>M. brunense</i><br><i>M. diernhoferi</i><br><i>M. fortuitum</i><br><i>M. marinum</i><br><i>M. parafortuitum</i><br><i>M. phlei</i><br><i>M. smegmatis</i><br><i>M. thamnophaeos</i><br><i>M. vaccae</i> |

## 2.2 Schnellwachsende atypische Mykobakterien

Die Keime, die in die Gruppe IV nach RUNYON (Tabelle 1) eingeordnet werden, sind in der Regel Saprophyten. Nach den Untersuchungen BEERWERTH's (3) sind sie als Bestandteil der normalen Bodenflora anzusehen. Je intensiver die Bodenbearbeitung durchgeführt wird, je besser also der Garezustand ist, desto häufiger sind schnellwachsende atypische Mykobakterien im Boden anzutreffen. So fand BEERWERTH (3) diese Keime häufiger in Ackererde als im Waldboden. Es handelt sich also um ubiquitär verbreitete Mikroorganismen. Man findet sie im Trinkwasser, im Futter, auf der Körperoberfläche und auf den Schleimhäuten als harmlose Begleit- und Verunreinigungskeime, jedoch können einzelne Arten manchmal auch bei Mensch und Tier Organveränderungen hervorrufen (46, 33). Aus der großen Anzahl der isolierten schnellwachsenden atypischen Mykobakterien wurden bis heute die in Tabelle 1 aufgeführten 11 Spezies differenziert und beschrieben.

Die Differenzierung dieser schnellwachsenden Mykobakterienarten erfolgt u.a. mit Hilfe der sog. "Amid-Reihe" nach BÖNICKE (7), der Kohlenhydratvergärung und der Reduktion von Nitriten in Anwesenheit von Kohlenhydraten als Elektronendonatoren (9).

Zusammenfassend läßt sich ihre Bedeutung in folgenden Tatbeständen aufzeigen:

1. Diese Keime werden gelegentlich aus tuberkulose-ähnlichen Veränderungen beim Menschen isoliert (11).

2. Bei Rind und Geflügel kann eine latente Infektion mit diesen Keimen zu einer Parallergie führen (48, 27).
3. Aus tuberkulosedähnlichen Veränderungen bei Schlachtschweinen sind des öfteren schnellwachsende Mykobakterien isoliert worden (35, 53).
4. In Großbritannien und in den USA wurden diese Keime vereinzelt bei Mastitiden von Milchkühen gefunden (37, 38, 42, 54, 57, 60).

## 2.3. Das Vorkommen von atypischen Mykobakterien in Milch

### 2.3.1. Vorkommen in Rohmilch

Die erste Mitteilung stammt aus dem Jahre 1898. PETRI (39) wies in Butterproben Tuberkuloseerregern ähnliche apathogene Stäbchen nach. RABINOWITSCH (41) prüfte diese Befunde nach und kam im wesentlichen zu denselben Ergebnissen.

HAAG (21) isolierte in den Jahren 1923 bis 1927 aus 90 Proben von Gartenerde, Walderde, Schlamm und Wasser aus Tümpeln, Mist von Haustieren, Timotheegras, Milch und Butter 72 mal "saprophytische" Mykobakterien. Er fand dabei in seinen Untersuchungen von 6 Butter- bzw. 3 Milchproben je zweimal *M.lacticola*. Diese Ergebnisse sprechen wie die vieler anderer Untersucher für die ubiquitäre Verbreitung dieser Keime.

MEYN und STÖFFLER (34) berichten über die Isolierung apathogener Mykobakterienarten aus Milchproben. Neben nicht differenzierten Arten wurden u.a. *M.phlei* und *M.lacticola* nachgewiesen.

1958/59 teilte der Japaner SASAKI (44) über die Isolierung von 105 Mykobakterienstämmen aus 1.037 Rohmilchproben folgendes mit: von den 105 Stämmen waren 47 "weiße", 27 "crimson", 18 "gelb" und 13 "farblos". 50 % der isolierten Stämme waren in ihrem allgemeinen Verhalten nicht von echten Tuberkelbakterien zu unterscheiden.

BÖNICKE und JUHASZ (8) beschrieben 1964 eine neue Mykobakterienart, *M.vaccae*, die sie aus Milch isoliert hatten.

CHAPMAN und BERNARD (12) konnten aus 720 Rohmilchproben in 261 Fällen (= 34 %) atypische Mykobakterien isolieren. Aus direkt dem Euter entnommener Milch gelang dagegen der Nachweis von atypischen Mykobakterien nur in 5 von 141 untersuchten Proben.

SCHLIESSER (46) konnte bei seinen Untersuchungen scotochromogene Mykobakterien aus Milch isolieren.

BRAUER (10) fand in 36, das sind 3,1 %, von 1.153 untersuchten Milchproben atypische Mykobakterien. 30 der isolierten Stämme konnten in die Gruppe der schnellwachsenden Mykobakterien eingeordnet werden. Die Milchproben waren direkt dem Euter entnommen worden. Der geringere Prozentsatz gegenüber den Rohmilchisolierungen zeigt, daß der Kontamination der Milch die Hauptrolle zukommt.

JONES (25) fand in Kanada in 77 von 123 untersuchten Rohmilchproben atypische Mykobakterien.

UNERTL (58) konnte 94 Stämme aus 84 von 572 auswertbaren Rohmilchproben isolieren. 8,1 % der Vorzugsmilchproben, 10 % der Kannenmilchproben und 24 % der Tankmilchproben enthielten in seinen Untersuchungen Mykobakterien. Von den angezüchteten Mykobakterienarten konnten aufgrund kultureller und biochemischer Eigenschaften 7 in die Gruppe II und 87 in die Gruppe IV nach RUNYON eingeordnet werden.

BEERWERTH (4) stellte in umfangreichen Untersuchungen in 51 von 642 (7,9 %) Einzel-Rohmilchproben, in 4 von 67 (5,9 %) verkaufsfertigen Vorzugsmilchproben und in 84 von 1.055 (7,9 %) Molkereianlieferungs-Milchproben Mykobakterien fest. Im Gegensatz zu den Untersuchungen UNERTL's (58) bildeten scotochromogene Mykobakterien den überwiegenden Anteil, während nur 27 Stämme der Gruppe IV nach RUNYON angehörten. BEERWERTH fand außerdem, daß sich Mykobakterien während des sommerlichen Weideganges häufiger als während der winterlichen Stallhaltung in Rohmilch nachweisen ließen (12,4 % gegenüber 2,6 %). Während des Sommers entsprach die Mykobakterienflora der Milch derjenigen des gleichzeitig untersuchten Weidebodens. Bei Untersuchungen im Winter ließen sich derartige Beziehungen nicht herstellen.

### 2.3.2. Vorkommen in pasteurisierter Milch

CHAPMAN und SPEIGHT (13) untersuchten in den USA 458 Proben pasteurisierter, abgepackter Handelsmilch. Sie konnten dabei aus 13 Proben, das sind 2,8 %, Mykobakterien isolieren. 1 Stamm erwies sich als *M. fortuitum*, 9 Stämme gehörten der Gruppe III nach RUNYON an und 3 Stämme wurden nicht näher klassifiziert. Als mögliche Quellen für die Keime nennen die Autoren die Milch selbst, die Milchleitungen in der Molkerei und die Milchverpackung (Kartons). In Übereinstimmung

mit anderen amerikanischen Autoren stellten sie weiterhin fest, daß 60 % der Isolierungen auf die Wintermonate entfielen. In den übrigen Monaten des Jahres wiesen sie im Gegensatz zu BEERWERTH prozentual weniger Mykobakterien nach.

BEERWERTH (4) konnte aus 2 von 112 Proben abgepackter Milch (1,7%) 5 Stämme, davon 2 aus der Gruppe IV nach RUNYON, isolieren.

Bei 178 untersuchten Proben nicht abgepackter Milch erwiesen sich 4 (2,2 %) mit Mykobakterien kontaminiert. 3 dieser Stämme wurden als schnellwachsende Mykobakterien differenziert. Als Reinfektionsquellen sieht BEERWERTH in erster Linie unzureichend gereinigte Rohrleitungen an.

#### 2.4. Nachweis von atypischen Mykobakterien bei Mastitiden

1951 berichteten STUART und HARVEY (54) erstmals von Mastitiden, die durch *M. smegmatis* und andere schnellwachsende säurefeste Stäbchen verursacht worden waren. Die Erkrankung trat in zwei Rinderherden auf und ging nachweislich mit einer Ausscheidung von Mykobakterien in der Milch einher. 2 Jahre später beschrieb TUCKER (57) 32 Fälle von produktiven Mastitiden, die vermutlich durch *M. fortuitum* hervorgerufen worden waren.

PETERSEN (38) berichtet von einer schweren Mastitis-Epizootie auf einer großen Milchvieh-Farm in Oregon. Von einer Herde mit 240 Tieren waren etliche Kühe erkrankt, die Mastitiden widerstanden jeder Therapie. 2 Kühe starben, 38 mußten zum Schlachten verkauft werden. Als Erreger wurde *M. fortuitum* ermittelt. Dieser Keim erwies sich als sehr pathogen bei intramammärer Applikation (eine durchschnittlich große Kolonie in 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert).

Die o.a. Autoren charakterisieren das Krankheitsbild als eine chronische Mastitis mit fortschreitender Induration und Hypertrophie. Es fanden sich zahlreiche Granulome mit einer Infiltration von polymorphkernigen Leukozyten und Histiozyten.

WILSON und BIRN (60) berichten über mehrere Mastitisfälle in 4 Milchviehherden, die durch schnellwachsende atypische Mykobakterien verursacht worden waren. In diesen Fällen sind vor dem Trockenstellen Antibiotika auf öligem Basis ohne entsprechende Hygienemaßnahmen von Laien verabreicht worden.

RICHARDSON (42) beschreibt 11 Mastitiserkrankungen, bei denen in 10 Fällen *M. smegmatis* und in einem Fall ein nicht typisierbarer Mykobakterienstamm beteiligt waren. RICHARDSON vermutet, daß aufgrund unsauberer Applikation von Antibiotika auf öligem Basis Mykobakterien ins Euter eingeschleppt wurden, mißt aber dieser Infektionsweise keine ausschließliche Bedeutung zu.

In jüngerer Zeit beschrieb NAYLOR (37) eine tuberkuloide Mastitis bei 25 Tieren einer Herde, die zuvor gegen Galt-Mastitis behandelt worden war. Mit Hilfe eines neu entwickelten Differenzierungsnährbodens isolierte er in allen Fällen *M. smegmatis*. Dieser Mykobakterienart schreibt NAYLOR eine bedeutende Rolle bei der sog. "tuberkuloiden" Mastitis zu.

## 2.5. Die Pasteurisierung der Milch

Die Milch ist ein ausgezeichneter Nährboden für nahezu alle Bakterien. Neben harmlosen Saprophyten und technologisch erwünschten Keimen bietet sie auch gefährlichen Zoonoseerregern wie z.B. Tuberkulosebakterien oder Brucellen ideale Lebensbedingungen. Um Verbraucher und letztlich auch Nutztiere, die Magermilch als Futtermittel erhalten, wirksam zu schützen, müssen geeignete Maßnahmen ergriffen werden. Die Pasteurisierung der Milch stellt eine solche seit langer Zeit gebräuchliche Schutzmaßnahme dar.

### 2.5.1. Gesetzliche Grundlagen der Milchpasteurisierung

Der § 12 (1) des Milchgesetzes (16) gibt den Behörden der Bundesländer u.a. die Ermächtigung, Erhitzungsverfahren für die Milch vorzuschreiben. Abgesehen von den Ausnahmeregelungen für Vorzugsmilch, Sterilmilch etc. ist die Pasteurisierung der Trinkmilch in allen Bundesländern vorgeschrieben. Im § 1 (3) der ersten Verordnung zur Ausführung des MG (16) wird eine Begriffsbestimmung für pasteurisierte Milch gegeben und die anerkannten Pasteurisierungsverfahren werden angeführt. Die Verordnung über hygienische Anforderungen an Milch bei der Einfuhr vom 23. Dezember 1969 (16) erläutert die Pasteurisierungsverfahren insofern etwas näher, als sie im § 1 (4) Nr. 2 die Kurzzeiterhitzung auf 71° bis 74° aufführt und in diesem Zusammenhang eine kürzeste Heizhaltezeit von 30 Sekunden bindend vorschreibt. Die Verordnung über Erhitzung von Milch zu Futterzwecken und Beseitigung von Zentrifugenschlamm aus Molke-reien schließlich verbietet es generell, unerhitzte Milch aus

Molkereien abzugeben. Diese Verordnung (16) führt im Einzelnen folgende Erhitzungsverfahren an:

1. Ultrahocherhitzung auf  $135^{\circ}$  -  $150^{\circ}\text{C}$
2. Hoherhitzung auf mindestens  $85^{\circ}\text{C}$
3. Kurzzeiterhitzung auf  $71^{\circ}$  -  $74^{\circ}\text{C}$   
bei Einhaltung einer kürzesten Heißhaltezeit  
von 30 Sekunden
4. Dauererhitzung auf  $62^{\circ}$  bis  $65^{\circ}\text{C}$  auf die  
Dauer von mindestens einer halben Stunde.

#### 2.5.2. Pasteurisierungsverfahren

Nach LAMPE (29) werden Hoherhitzung (HE) und Kurzzeiterhitzung (KZE) in der Bundesrepublik Deutschland in größerem Umfange angewandt. Besondere Kritik in hygienischer Hinsicht haftet nur der KZE an (6). Ihr Ablauf vollzieht sich im Prinzip wie folgt: Die Milch gelangt über zwei Wärmetauscher, die  $40 - 45^{\circ}\text{C}$  bzw.  $50 - 60^{\circ}\text{C}$  aufweisen, in die Heißhalteabteilung des Kurzzeiterhitzers, in dem für 30 - 40 Sekunden eine Temperatur von  $71 - 74^{\circ}\text{C}$  einwirkt (32). Der Verlauf der Erhitzung wird über einen Temperaturschreiber kontrolliert. Die Anlagen sind so geschaltet, daß nur die Milch, die dieser Temperatur-Zeit Kombination unterlegen hat, die Anlage verläßt.

Die Zuverlässigkeit der Pasteurisierungsverfahren hat seit der Jahrhundertwende zahllose Autoren beschäftigt, immer wieder waren es die Tuberkuloseerreger, an denen sich die Kritik entzündete. LAMPE (29) stellt fest, daß diese Keime aufgrund ihrer besonderen Thermoresistenz geradezu als Maßstab für den Pasteurisierungserfolg zu gelten haben und kommt mit SEELMANN (49) zu der Auffassung, daß es keine besonders thermoresistenten TB-Stämme gebe. Aufsehererregende

Arbeiten seien z.T. vorschnell und kritiklos veröffentlicht worden. Diese erschienen seinerzeit geeignet, an den Grundlagen der Hitze-pasteurisierung zu rütteln, indem sie eine angeblich höhere Hitze-resistenz mancher TB-Stämme zum Anlaß nahmen, den Wert der Pasteu-risierung herabzusetzen (30, 23, 20). Nach LAMPE (29) und HILBURG (24) sind beim Nachweis von Mykobakterien in erhitzter Milch in nahezu allen Fällen Fehler im technischen Ablauf der Pasteurisierung zu suchen.

STUR (55) kommt in seinen Versuchen zu dem Ergebnis, daß die Hitze-resistenz der Tuberkelbakterien in der gleichen Größenordnung vieler anderer vegetativer Bakterienformen liegt.

## 2.6. Zur Prüfung der Thermoresistenz von Mikroorganismen in Laboratoriumsversuchen

Pasteurisierungsmaßnahmen an Lebensmitteln müssen der Anforderung genügen, pathogene Mikroorganismen ausreichend sicher abzutöten. Die Prüfung der Thermoresistenz kann einmal mit mehr oder weniger aufwendigen Labormethoden oder aber an Pasteurisierungsanlagen selbst erfolgen. Zweifellos kommt der Überprüfung von Pasteurisie-rungsanlagen, wie sie in der Molkereipraxis verwandt werden, die größte Bedeutung zu. Alle Anlagen, die in der Bundesrepublik in-stalliert werden, müssen einer amtlichen Prüfung unterzogen wer-den, bevor sie für die praktische Nutzung zugelassen werden.

Im Laborversuch sind zahlreiche Versuche mit allen möglichen pathogenen Mikroorganismen durchgeführt worden, um Abtötungswerte aus Temperatur-Zeit-Kombinationen zu ermitteln. Dabei wurde unter den unterschiedlichsten Bedingungen gearbeitet. Die wichtigsten Methoden sollen hier kurz erwähnt werden, ohne Anspruch auf Voll-

ständigkeit zu erheben:

Ein schon historischer Streit der Forscher de JONG (26), VAN DER SLUIS (51), BASENAU (2) und FORSTER (18) zeigt die Problematik, die unterschiedliche Labormethoden aufwerfen, und wie stark die Abweichungen sein können. Während FORSTER (18) mit möglichst geringen Mengen an zu erhitzendem Substrat arbeitete, versuchten die anderen den Praxisverhältnissen so nahe wie möglich zu kommen. Sie erhitzten Milchflaschen in handelsüblicher Größe im Wasserbad, also in einer Weise, in der damals die Pasteurisierung durchgeführt wurde. Auf heftige Attacken FORSTER's (18), der seine Ergebnisse als unanfechtbar ansah und andere Untersucher mit anderen Resultaten des Angriffs auf seine Person bezichtigte und ihnen physikalisches Unverständnis vorwarf, antwortete BASENAU: "In der Praxis erhitzt man Flaschen mit Milch und nicht kapilläre Röhrchen oder Reagenzgläsern. Hierin liegt die Ursache unserer verschiedenen Ergebnisse." Eine Aussage, die für manche später ausgefochtenen Differenzen eine gewisse Aktualität behalten hat.

Haben wir hier die Erhitzung von Flaschen oder Reagenzgläsern im Wasserbad, so wurden später weitere Möglichkeiten entwickelt und angewandt:

Verschlossene Reagenzgläser werden im strömenden Dampf, im Wasser- oder Ölbad erhitzt. Die Kontrolle erfolgt über axial eingebrachte Thermometer (40, 5).

Dünnwandige, zugeschmolzene kleine Ampullen werden in einer Vorrichtung, die gleichzeitig als Rührwerk dient, im Wasserbad erhitzt (31).

LARMOLA (30) erhitzte eine physiologische Kochsalzlösung in einem Wärmeschrank auf die gewünschte Temperatur und beimpfte diese Lösung dann mit dem Untersuchungsgut.

Ebenfalls eine vorgewärmte Flüssigkeit benutzte STUR (55). Er trocknete die Keime auf einem Objektträger an und tauchte sie dann für die gewünschte Zeit in die Flüssigkeit ein.

BINGEL (6) beschichtete einen Kupferzylinder in dünner Schicht mit dem Untersuchungsgut. Der rotierende Zylinder (an einer Zahnbohrmaschine befestigt) wurde dann in ein Wasserbad eingetaucht.

GANTZ (19) konstruierte Geräte, die den Praxisverhältnissen möglichst nahe kommen sollten. Sie ahmen praktisch einen Kurzzeiterhitzer nach.

Einen im Vergleich zu den o.g. Methoden sehr einfachen Laborversuch beschreibt DEDIE (14). Er hat mit dieser Versuchsanordnung die Hitzeresistenz von *Listeria monocytogenes* untersucht. Die zu testende Suspension wird in Glaskapillaren von etwa 0,3 mm lichter Weite aufgezogen. Die Kapillaren werden zugeschmolzen und im Wasserbad für die gewünschte Zeit erhitzt. Nach dem Abkühlen in Leitungswasser wird der Inhalt durch vorsichtiges Ausblasen in 2 - 3 Röhrchen mit je 5 ccm Serumbouillon gegeben. Erwärmungs- und Abkühlungszeit hält DEDIE bei diesem Verfahren für äußerst kurz und die Durchwärmung des Flüssigkeitsfadens für gleichmäßig. Im Gegensatz zu Versuchen mit verschiedenen Röhrchen, die immer wieder unterschiedliche Ergebnisse brachten, sind mit dieser Kapillarmethode sicher reproduzierbare Resultate ermöglicht worden.

FINKBEINER (17) verwendete diese Methode mit Erfolg auch in seinen Versuchen mit *M. avium*-Stämmen. Er konnte feststellen, daß diese

Erreger den bei der Kurzzeiterhitzung angewendeten Temperaturen von 71°- 74°C gegenüber keine größere Resistenz besaßen als *M.bovis* oder *M.tuberculosis*.

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. Material und Methodik

##### 3.1.1. Teststämme zur Untersuchung der Thermoresistenz

Für die Untersuchungen standen folgende Mykobakterienarten zur Verfügung: *Mycobacterium borstelense*, 10 Stämme (S 24, S 25, S 26, S 27, S 28, S 29, S 30, S 31, S 32 und S 34), *Mycobacterium diernhoferi*, 10 Stämme (S 47, S 48, S 49, S 50, S 51, S 52, S 54, S 55, S 56 und S 57), *Mycobacterium fortuitum*, 10 Stämme (S 41, S 43, S 45, S 46, MF 14, MF 16, MF 19, MF 21, MF 50 und MF 288), *Mycobacterium phlei*, 10 Stämme (S 5, S 7, S 8, S 9, S 10, S 11, S 12, S 13, S 15 und S 16), *Mycobacterium smegmatis*, 10 Stämme (Sm 1, Sm 2, Sm 3, Sm 4, Sm 14, Sm 15, Sm 16, Sm 17, Sm 18 und Sm 20), *Mycobacterium vaccae*, 10 Stämme (S 62 bis S 71), sowie 9 Stämme von *Mycobacterium thamnophaeus*, die Stämme S 17 bis S 23, S 39 und S 42. Alle Stämme von *Mycobacterium smegmatis* und 6 Stämme von *M.fortuitum* (S 41, MF 14, MF 16, MF 19, MF 21, MF 50, MF 288) wurden willkürlich aus der Stammsammlung des Instituts entnommen. Die übrigen 53 Stämme waren im Jahre 1968 von UNERTL (58) aus Rohmilchproben isoliert worden.

##### 3.1.2. Teststämme zur Untersuchung der Vermehrung in Milch

*M.borstelense*, (Stämme S 28 und S 29), *M.diernhoferi* (Stämme S 47 und S 48), *M.phlei* (Stämme S 9 und S 10), *M.thamnophaeus* (Stämme S 21 und S 39), *M.vaccae* (Stämme S 62 und S 63). Alle Stämme stammten aus Rohmilchproben.

### 3.1.3. Nährböden

Löwenstein-Jensen-Eiernährboden: Seine Herstellung erfolgte unter Verwendung der bereits fertigen Grundsubstanz (Eiernährböden nach Löwenstein-Jensen, Merck, Art. Nr. 5400) nach den angegebenen Vorschriften. Er wurde je nach Bedarf in Glaspetrischalen oder als Schrägagar in Röhrchen abgefüllt.

#### Tween-Bouillon mit Glycerin:

- 1 % Glycerin (Riedel de Haen)
- 0,88 % Tween 80 (Serva)
- 0,5 % Pepton aus Fleisch (Merck, Art.Nr. 7214)
- 0,3 % Fleischextrakt (Liebig Company, Antwerpen)

pH-Wert 7,0, Abfüllung zu je 5 ml in Röhrchen.

### 3.1.4. Milch zur Untersuchung der Vermehrung von Mykobakterien

Die Milch stammte von klinisch gesunden Kühen, die nicht unter antibiotischer Behandlung standen. Zur Gewinnung der Milch wurde das Euter mit warmem Seifenwasser abgewaschen und nach dem Abtrocknen wurden die Zitzen mit 70%igem Alkohol gereinigt. Nach Verwerfen der ersten Milchstrahlen wurde die Milch in einem sterilen Gefäß aufgefangen. 2 - 3 Stunden nach der Gewinnung wurde die Milch zentrifugiert und an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 20 Minuten im Dampftopf erhitzt. Auf diese Weise sollte eine ausreichende Vernichtung aller in der Milch vorhandener Keime erreicht werden (28). Abfüllung zu je 5 ml in sterile Reagenzröhrchen, Verschuß mit Zellstoffstopfen.

### 3.1.5. Methodik zur Untersuchung der Thermoresistenz

Die Thermoresistenz bei 71 und 74°C im Zeitraum von 5 bis 80 Sekunden wurde nach den von FINKBEINER (17) in Anlehnung an die von DEDIE (14) entwickelten Labormethoden unter Verwendung von selbstgezogenen ca. 20 cm langen Glaskapillaren von 0,4 - 0,5 mm Stärke untersucht.

Als Keimsuspensionen wurden 3 Tage, in der Wiederholung 5 Tage alte Kulturen der Mykobakterien in glycerinhaltiger Tweenbouillon verwendet. Aus den frisch aufgeschüttelten und gleichmäßig homogenen Kulturen (ca.  $10^5$  -  $10^6$  koloniebildende Einheiten/ml) wurde mit den Kapillaren eine Flüssigkeitssäule von ca. 10 cm aufgezogen und die Spitze der Kapillare über dem Bunsenbrenner zugeschmolzen. Dann wurden die Kapillaren im Wasserbad bei 71°C und 74°C erhitzt. Die Eintauchdauer lag zwischen 5 und 80 Sekunden. Nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 und 80 Sekunden wurden jeweils Kapillaren aus dem Wasserbad entnommen und für 1 Minute in kaltem Leitungswasser abgekühlt. Nach Abbrechen der Kapillarspitze wurden die ersten ca. 3 - 5 cm der Flüssigkeitssäule verworfen und vom Rest ein Tropfen Keimsuspension auf Löwenstein-Jensen Nährboden, der in Petrischalen ausgegossen war, gegeben. Pro Stamm wurde eine Platte verwendet, wobei die verschieden lange erhitzten Proben jeweils im Uhrzeigersinn aufgetropft wurden. Dadurch ließ sich das Keimwachstum besonders gut vergleichen.

Die beimpften Platten wurden bei täglicher Überprüfung auf Koloniewachstum 5 Tage lang bei 37°C bebrütet. Die Beurteilung der Wachstumsintensität wurde wie folgt durchgeführt:

1 - 10 Kolonien +, 10 - 20 Kolonien ++, zusammenhängendes Wachstum wie in der Kontrolle +++ . Alle Versuche wurden für jeden Temperaturbereich doppelt ausgeführt. 4 Stämme von *M.phlei* (S 8, S 9, S 10 und S 15) wurden außer bei 71 und 74°C auch bei 76, 78 und 80°C getestet.

### 3.1.6. Untersuchung der Vermehrung in Milch

Die Teststämme wurden 4 Tage lang auf Löwenstein-Jensen Eiernährböden bei 37°C angezüchtet. Mit der Öse entnommene Kolonien wurden in Porzellanmörsern mit einem Pistill fein verrieben und unter Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung soweit verdünnt bis die Trübung der Suspension derjenigen einer Bariumsulfatkonzentration von 1 mg/ml Aqua dest. entsprach. Das Trübungsröhrchen wurde wie folgt hergestellt: 90 mg Bariumchlorid auf 99 ml Aqua dest. + 1 ml 1 n  $H_2SO_4$  (15). Von der eingestellten Bakteriensuspension wurde mit physiologischer NaCl-Lösung eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen bis zu einer Verdünnung von  $10^{-7}$  angelegt. Aus den Röhrchen der Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  wurden jeweils 0,5 ml in je 5 ml Milch überimpft. Die beimpften Röhrchen wurden bei Zimmertemperatur (18 - 22°C) im Dunklen aufbewahrt. Gleichzeitig wurden 0,05 ml der entsprechenden Verdünnungsstufen auf der Oberfläche eines in Petrischalen ausgegossenen Löwenstein-Jensen Eiernährbodens ausgespatelt, um die Einsaatdichte festzustellen. Die Bebrütung dieser Platten erfolgte 5 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach 24, 48 und 72 Stunden, 4, 5 und 6 Tagen wurden aus den infizierten Milchproben jeweils 0,2 ml entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung in Zehnerpotenzen verdünnt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann wiederum 0,05 ml auf Löwenstein-Jensen Eiernährböden ausgespatelt. Nach anschließender 5-tägiger Bebrütung bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die

gewachsenen Kolonien mit Hilfe eines Keimzählgerätes (Placont, Boskamp) ausgezählt. Durch Multiplikation mit 20 und den jeweiligen Verdünnungsstufen wurde die Keimdichte pro ml errechnet. Die ermittelte Einsaat-Keimmenge zu Versuchsbeginn wurde gleich 1 gesetzt. Die in den folgenden Bebrütungszeiten ermittelten Keimzahlen wurden durch die Ausgangskeimzahl dividiert, um so die relativen Keimzahlen zu erhalten. Alle Versuche wurden mit jedem Stamm doppelt durchgeführt, auf diese Weise erhielt ich vergleichbare relative Keimzahlen, aus denen die relativen Mittelwerte errechnet wurden.

### 3.2. Ergebnisse

#### 3.2.1. Untersuchung der Thermoresistenz bei 71°C

Die Ergebnisse der Überprüfung der einzelnen Mykobakterienarten mittels Kapilliarprobe bei 71°C unter Zugrundelegung des Mittelwertes aus jeweils zwei Untersuchungen sind in Tabelle 1 - 7 zusammengestellt.



TABELLE 3 Hitzeresistenz von *M. fortuitum* bei 71°C

| Stamm  | 5 | E i n t a u c h d a u e r (Sekunden) |    |    |    |    |    |    |    |
|--------|---|--------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
|        |   | 10                                   | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 |
| S 41   | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 43   | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 45   | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 46   | + | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| MF 14  | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| MF 16  | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| MF 19  | + | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| MF 21  | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| MF 50  | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| MF 288 | - | -                                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

TABELLE 4 Hitzeresistenz von *M. phlei* bei 71°C

| Stamm | 5   | E i n t a u c h d a u e r (Sekunden) |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|       |     | 10                                   | 15  | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  | 80  |
| S 5   | +   | +                                    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| S 7   | ++  | +                                    | +   | +   | +   | +   | +   | ++  | +   |
| S 8   | +++ | ++                                   | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | +   |
| S 9   | +++ | +++                                  | +++ | ++  | ++  | +   | ++  | +   | +   |
| S 10  | +++ | ++                                   | ++  | ++  | ++  | +   | ++  | +   | +   |
| S 11  | +++ | ++                                   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| S 12  | ++  | +                                    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| S 13  | ++  | +                                    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| S 15  | +++ | +++                                  | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| S 16  | +++ | ++                                   | ++  | ++  | ++  | ++  | +   | +   | +   |

TABELLE 5 Hitzeresistenz von *M. smegmatis* bei 71°C

| Stamm | <u>E i n t a u c h d a u e r (Sekunden)</u> |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-------|---------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
|       | 5                                           | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 |
| SM 1  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 2  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 3  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 4  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 14 | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 15 | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 16 | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 17 | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 18 | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| SM 20 | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

TABELLE 6 Hitzeresistenz von *M. thamnophaeos* bei 71°C

| Stamm | <u>E i n t a u c h d a u e r (Sekunden)</u> |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-------|---------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
|       | 5                                           | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 |
| S 17  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 18  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 19  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 20  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 21  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 22  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 23  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 39  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 42  | +++                                         | ++ | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

TABELLE 7 Hitzeresistenz von *M.vaccae* bei 71°C

| Stamm | <u>E i n t a u c h d a u e r (Sekunden)</u> |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-------|---------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
|       | 5                                           | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 |
| S 62  | +++                                         | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 63  | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 64  | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 65  | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 66  | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 67  | ++                                          | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 68  | ++                                          | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 69  | -                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 70  | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 71  | +                                           | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

### 3.2.2. Untersuchung der Thermoresistenz bei 74°C

Bei 74°C wiesen alle untersuchten Stämme von *M.borstelense*, *M.fortuitum*, *M.diernhoferi*, *M.smegmatis*, *M.thamnopheos* und *M.vaccae* nach einer Einwirkungszeit von 5 Sekunden keinerlei Wachstum mehr auf. Auf eine tabellarische Zusammenstellung dieser Befunde wurde deshalb verzichtet.

Das Verhalten von *M.phlei* bei 74°C ist in Tabelle 8 dargestellt.

TABELLE 8 Hitzeresistenz von M.phlei bei 74°C

| Stamm | E i n t a u c h d a u e r (Sekunden) |     |     |     |     |     |    |    |    |
|-------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
|       | 5                                    | 10  | 15  | 20  | 30  | 40  | 50 | 60 | 80 |
| S 5   | ++                                   | ++  | +   | +   | +   | +   | +  | +  | -  |
| S 7   | +                                    | +   | +   | +   | -   | -   | -  | -  | -  |
| S 8   | ++                                   | +   | +   | +   | +   | +   | +  | +  | +  |
| S 9   | +                                    | +   | +   | +   | +   | +   | +  | +  | +  |
| S 10  | ++                                   | +++ | ++  | ++  | +   | +   | +  | +  | +  |
| S 11  | ++                                   | ++  | +   | +   | +   | +   | -  | -  | -  |
| S 12  | +                                    | +   | +   | +   | +   | +   | +  | -  | -  |
| S 13  | +                                    | +   | -   | -   | -   | -   | -  | -  | -  |
| S 15  | +++                                  | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +  | +  |
| S 16  | +++                                  | ++  | +   | +   | +   | -   | -  | -  | -  |

### 3.2.3. Untersuchung der Hitzeresistenz von M.phlei bei 76°C, 78°C und 80°C

-----

Da 4 Stämme von M.phlei (S 8, S 9, S 10 und S 15) eine 80 Sekunden dauernde Einwirkung von 74°C überlebt haben, wurden diese noch bei höheren Temperaturen überprüft.

Die Ergebnisse bei 76, 78 und 80°C sind unter Zugrundelegung des Mittelwertes aus jeweils zwei Untersuchungen in den Tabellen 9 - 11 dargestellt.

TABELLE 9 Hitzeresistenz von M.phlei bei 76°C

| Stamm | E i n t a u c h d a u e r (Sekunden) |     |     |     |     |    |    |    |    |
|-------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
|       | 5                                    | 10  | 15  | 20  | 30  | 40 | 50 | 60 | 80 |
| S 8   | +++                                  | ++  | +++ | +   | +   | +  | +  | +  | -  |
| S 9   | +++                                  | +++ | +++ | ++  | +   | +  | +  | +  | -  |
| S 10  | +++                                  | +++ | +++ | +   | +   | +  | +  | -  | -  |
| S 15  | +++                                  | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +  | +  | +  |

TABELLE 10 Hitzeresistenz von M.phlei bei 78°C

| Stamm | E i n t a u c h d a u e r (Sekunden) |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-------|--------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
|       | 5                                    | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 |
| S 8   | +++                                  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  |
| S 9   | +                                    | +  | +  | +  | +  | -  | +  | -  | -  |
| S 10  | ++                                   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -  |
| S 15  | ++                                   | ++ | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

TABELLE 11 Hitzeresistenz von M.phlei bei 80°C

| Stamm | E i n t a u c h d a u e r (Sekunden) |    |    |    |    |
|-------|--------------------------------------|----|----|----|----|
|       | 5                                    | 10 | 15 | 20 | 30 |
| S 8   | +                                    | +  | -  | -  | -  |
| S 9   | ++                                   | +  | +  | -  | -  |
| S 10  | +                                    | +  | -  | -  | -  |

### 3.2.4. Untersuchungen über die Vermehrung von Mykobakterien in Milch

-----

Die Ergebnisse der Keimzählungen für die untersuchten Mykobakterienarten sind unter Zugrundelegung des Mittelwertes aus jeweils zwei Versuchen in den Tabellen 12 - 16 dargestellt. Neben den absoluten Keimzahlen pro ml Milch ist auch der Vermehrungsindex angegeben, der sich wie folgt berechnet:

$$\text{Vermehrungsindex (VI)} = \frac{\text{Keimzahl / ml Milch}}{\text{Einsaatkeimzahl / ml Milch}}$$

Diese Berechnung ermöglicht einen direkten Vergleich der fünf untersuchten Arten miteinander (Abb. 4, Tab. 18), da die Keimmenge pro ml zu Versuchsbeginn gleich 1 gesetzt wird.

TABELLE 12 Vermehrung von *M. borstelense* in Milch bei Zimmertemperatur

| Zeit<br>(Std.) | Stamm S 28  |                   | Stamm S 29  |                   |
|----------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
|                | Keimzahl/ml | VI                | Keimzahl/ml | VI                |
| 0<br>(Einsaat) | 12          | 1                 | 38          | 1                 |
| 24             | 50          | $4,1 \times 10^0$ | 165         | $4,0 \times 10^0$ |
| 48             | 50          | $4,1 \times 10^0$ | 260         | $6,9 \times 10^0$ |
| 72             | 100         | $8,3 \times 10^0$ | 245         | $6,7 \times 10^0$ |
| 96             | 90          | $7,5 \times 10^0$ | 460         | $1,2 \times 10^1$ |
| 120            | 180         | $1,5 \times 10^1$ | 3600        | $9,5 \times 10^1$ |
| 144            | 170         | $1,4 \times 10^1$ | 21000       | $6,3 \times 10^2$ |

TABELLE 13 Vermehrung von *M.diernhoferi* in Milch bei Zimmertemperatur

| Zeit<br>(Std.) | Stamm S 47  |                   | Stamm S 48  |                   |
|----------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
|                | Keimzahl/ml | VI                | Keimzahl/ml | VI                |
| 0<br>(Einsaat) | 81          | 1                 | 72          | 1                 |
| 24             | 250         | $3,1 \times 10^0$ | 150         | $2,1 \times 10^0$ |
| 48             | 330         | $4,1 \times 10^0$ | 300         | $4,2 \times 10^0$ |
| 72             | 340         | $4,2 \times 10^0$ | 370         | $5,2 \times 10^0$ |
| 96             | 610         | $7,7 \times 10^0$ | 250         | $3,4 \times 10^0$ |
| 120            | 1 870       | $2,3 \times 10^1$ | 440         | $6,2 \times 10^0$ |
| 144            | 7 180       | $7,7 \times 10^1$ | 3 520       | $4,9 \times 10^1$ |

TABELLE 14 Vermehrung von *M.phlei* in Milch bei Zimmertemperatur

| Zeit<br>(Std.) | Stamm S 9   |                   | Stamm S 10  |                   |
|----------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
|                | Keimzahl/ml | VI                | Keimzahl/ml | VI                |
| 0<br>(Einsaat) | 8           | 1                 | 48          | 1                 |
| 24             | 170         | $2,1 \times 10^1$ | 630         | $1,3 \times 10^1$ |
| 48             | 780         | $9,7 \times 10^1$ | 2 820       | $5,9 \times 10^1$ |
| 72             | 5 000       | $6,3 \times 10^2$ | 6 700       | $1,3 \times 10^2$ |
| 96             | 54 000      | $6,7 \times 10^3$ | 92 000      | $1,9 \times 10^3$ |
| 120            | 144 000     | $1,8 \times 10^4$ | 516 000     | $1,0 \times 10^4$ |
| 144            | 450 000     | $5,3 \times 10^4$ | 761 000     | $1,5 \times 10^4$ |

TABELLE 15 Vermehrung von *M.thamnopheos* in Milch bei Zimmertemperatur

| Zeit<br>(Std.) | Stamm S 21<br>Keimzahl/ml VI | Stamm S 39<br>Keimzahl/ml VI |
|----------------|------------------------------|------------------------------|
| 0<br>(Einsaat) | 44 1                         | 37 1                         |
| 24             | 235 $5,3 \times 10^0$        | 300 $8,1 \times 10^0$        |
| 48             | 5 700 $1,3 \times 10^2$      | 4 550 $1,5 \times 10^2$      |
| 72             | 172 000 $3,9 \times 10^3$    | 109 000 $2,7 \times 10^3$    |
| 96             | 1,1 Mio. $2,3 \times 10^4$   | 792 000 $2,4 \times 10^4$    |
| 120            | 15 Mio. $3,2 \times 10^5$    | 6,4 Mio. $1,2 \times 10^5$   |
| 144            | 170 Mio. $3,9 \times 10^6$   | 114 Mio. $3,1 \times 10^6$   |

TABELLE 16 Vermehrung von *M.vaccae* in Milch bei Zimmertemperatur

| Zeit<br>(Std.) | Stamm S 62<br>Keimzahl/ml VI | Stamm S 63<br>Keimzahl/ml VI |
|----------------|------------------------------|------------------------------|
| 0<br>(Einsaat) | 70 1                         | 212 1                        |
| 24             | 270 $3,5 \times 10^0$        | 770 $3,5 \times 10^0$        |
| 48             | 2 030 $2,9 \times 10^1$      | 9 540 $4,5 \times 10^1$      |
| 72             | 24 500 $3,5 \times 10^2$     | 76 300 $3,6 \times 10^2$     |
| 96             | 229 000 $3,3 \times 10^3$    | 680 400 $3,4 \times 10^3$    |
| 120            | 2,4 Mio. $3,3 \times 10^4$   | 6,6 Mio. $3,1 \times 10^4$   |
| 144            | 12,6 Mio. $1,8 \times 10^5$  | 34 Mio. $1,7 \times 10^5$    |

### 3.3. Besprechung der Ergebnisse

#### 3.3.1. Untersuchungen der Thermoresistenz

Die Ergebnisse der Überprüfung der Thermoresistenz verschiedener schnellwachsender atypischer Mykobakterien bei 71°C sind in Tabelle 17 zusammenfassend dargestellt.

TABELLE 17 Hitzeresistenz schnellwachsender atypischer Mykobakterien bei 71°C  
(Kapillarprobe)

| Art           | Zahl der<br>untersucht.<br>Stämme | Wachstum nach einer Eintauchdauer (Sekunden) |                  |         |         |         |         |         |         |         |  |
|---------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
|               |                                   | 5                                            | 10               | 15      | 20      | 30      | 40      | 50      | 60      | 80      |  |
| M.borstelense | 10                                | + <sup>1)</sup>                              | -                | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       |  |
| M.diernhoferi | 10                                | -                                            | -                | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       |  |
| M.fortuitum   | 10                                | + <sup>1)</sup>                              | -                | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       |  |
| M.phlei       | 10                                | + + + +                                      | + + + +          | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + | + + + + |  |
| M.smegmatis   | 10                                | + <sup>2)</sup>                              | -                | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       |  |
| M.thamnopeos  | 9                                 | + + + <sup>2)</sup>                          | ++ <sup>2)</sup> | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       |  |
| M.vaccae      | 10                                | + + + + <sup>3)</sup>                        | -                | -       | -       | -       | -       | -       | -       | -       |  |

Zeichenerklärung: +, ++, +++: Wachstum  
-: kein Wachstum  
1): 2 Stämme  
2): 1 Stamm  
3): 9 Stämme

War das Verhalten einzelner Stämme der geprüften Arten nach einer Einwirkungszeit von 5 Sekunden noch unterschiedlich, so wurden alle 10 Stämme von *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.vaccae* und 8 Stämme von *M.thamnopheos* nach einer 10 Sekunden dauernden Einwirkung abgetötet. Nach 15 Sekunden zeigte auch der letzte Stamm von *M.thamnopheos* kein Wachstum mehr. Dagegen haben alle 10 Stämme von *M.phlei* eine 80 Sekunden dauernde Einwirkung von  $71^{\circ}\text{C}$  überlebt, wenngleich eine gewisse Keimreduzierung bemerkbar war. Nur ein Stamm (S 15) zeigte keinerlei Wachstumseinschränkung (Abb.1).



Abb. 1: Einfluss von  $71^{\circ}\text{C}$  zwischen 5 und 80 Sekunden auf *M.phlei* (S 15) im Kapillartest  
(K = nicht erhitzte Kontrolle)

Bei 74°C wiesen alle untersuchten Stämme von *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.thamnopheos* und *M.vaccae* nach einer Einwirkungszeit von 5 Sekunden bereits keinerlei Wachstum mehr auf. Von *M.phlei* wurden bei dieser Temperatur 3 Stämme (S 7, S 13 und S 16) nach 40 Sekunden, je 1 Stamm nach 50 Sekunden (S 11) bzw. 60 Sekunden (S 12) abgetötet. Der Stamm S 5 überstand eine 60 Sekunden dauernde Erhitzung, die Stämme S 8, S 9, S 10 und S 15 sogar eine 80 Sekunden dauernde Einwirkung, allerdings unter erheblicher Einbüßung der Wachstumsintensität. Abbilung 2 zeigt beispielhaft die Abnahme der Keimzahl in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer beim Stamm S 9.

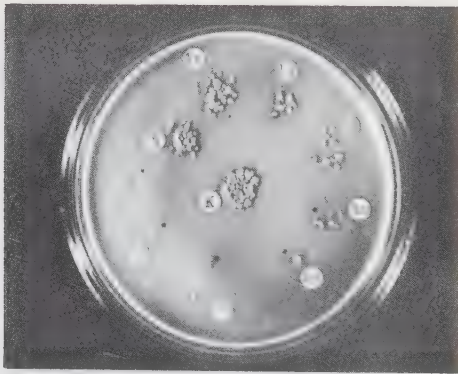


Abb. 2:Einfluß von 74°C zwischen 5 und 80 Sekunden auf *M.phlei* (S 9) im Kapillartest  
(K = nicht erhitzte Kontrolle)

Bei 76°C überstanden der Stamm S 10 eine 50 Sekunden dauernde und die Stämme S 15 (Abb. 3), S 9 und S 8 eine 60 Sekunden dauernde Erhitzung nur unter erheblicher Einbuße der Wachstumsintensität (Tab. 9).



Abb. 3: Einfluß von 76°C zwischen 5 und 80 Sekunden auf *M.phlei* (S 15) im Kapillartest (K = nicht erhitzte Kontrolle)

Auch nach einer Erhitzung der Phlei-Stämme in Wasserbad auf 80°C konnte nach 10 Sekunden (S 8) bzw. nach 15 Sekunden (S 9 und S 10) noch geringes Kolonienwachstum (1 - 2 Kolonien) beobachtet werden (Tab. 11).

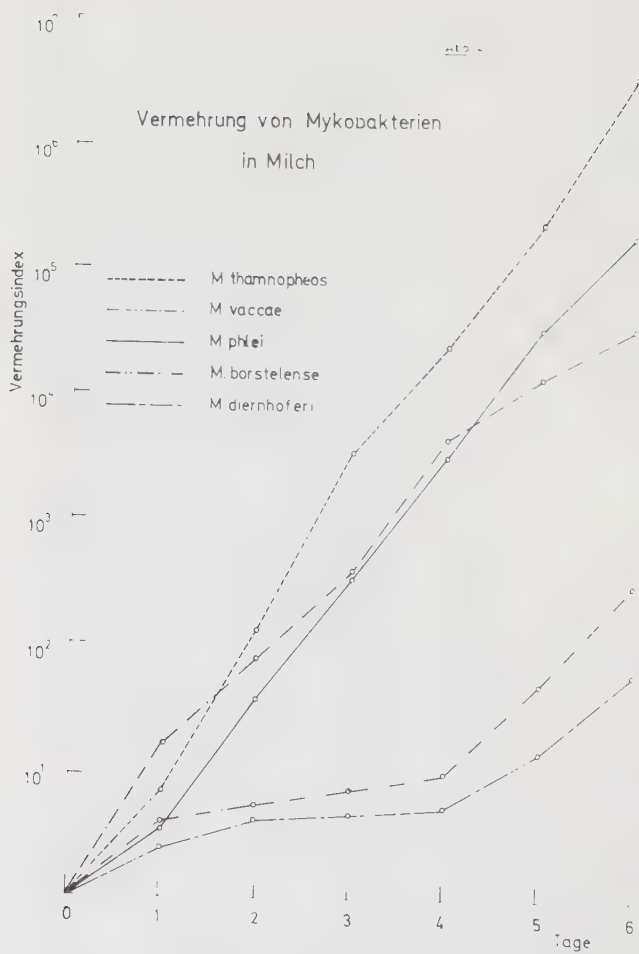
### 3.3.2. Vermehrung von Mykobakterien in Milch

Um einen möglichst objektiven Vergleichsmaßstab über die Vermehrung der einzelnen Mykobakterienarten in Milch bei Zimmertemperatur zu erhalten, wurden die Vermehrungsindices für jede Keimart errechnet. In Tabelle 18 sind sie vergleichend dargestellt.

TABELLE 18 Vermehrungsindex verschiedener Mykobakterienarten in Milch  
bei Zimmertemperatur

| Art            | Anz.<br>d.<br>Vers. | B e e r u t u n g s d a u e r (Std.) |                   |                   |                   |                   |                   |
|----------------|---------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                |                     | 24                                   | 48                | 72                | 96                | 120               | 144               |
| M. borstelense | 4                   | $4,1 \times 10^0$                    | $5,5 \times 10^0$ | $7,0 \times 10^0$ | $1,0 \times 10^1$ | $4,9 \times 10^1$ | $3,2 \times 10^2$ |
| M. diernhoferi | 4                   | $2,6 \times 10^0$                    | $4,2 \times 10^0$ | $4,7 \times 10^0$ | $5,6 \times 10^0$ | $1,5 \times 10^1$ | $6,3 \times 10^1$ |
| M. phlei       | 4                   | $1,7 \times 10^1$                    | $7,8 \times 10^1$ | $3,8 \times 10^2$ | $4,3 \times 10^2$ | $1,4 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^4$ |
| M. thamnopheos | 8                   | $6,7 \times 10^0$                    | $1,4 \times 10^2$ | $3,3 \times 10^3$ | $2,4 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^5$ | $3,5 \times 10^6$ |
| M. vaccae      | 4                   | $3,5 \times 10^0$                    | $3,7 \times 10^1$ | $3,5 \times 10^2$ | $3,2 \times 10^3$ | $3,2 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^5$ |

Aus dieser Tabelle und Abb. 4 ist ersichtlich, daß das Verhalten der 5 untersuchten Mykobakterienarten nicht einheitlich war. Die Stämme von *M.borstelense* und *M.diernhoferi* zeigten bis zum 4. Tage eine nur geringe Vermehrung. Erst danach war eine deutliche Zunahme der Keimmenge zu beobachten und bis zum 6. Tage hatte sich die eingebrachte Keimmenge um das 100-fache vermehrt. *M.phlei*, *M.thamnopheose* und *M.vaccae* dagegen zeigten innerhalb der ersten 48 Stunden eine starke Vermehrung. Am dritten Tag wurden Keimzahlen erreicht, die etwa um den Faktor  $10^3$  über den Ausgangskeimzahlen lagen. Während der weiteren Beobachtungsdauer bis zum 6. Tag nahm die Keimzahl kontinuierlich aber nicht mehr so deutlich exponentiell zu. Am 6. Tag betrug die ermittelte Keimmenge bei diesen 3 Arten das ca.  $10^5$  bis  $10^6$ -fache der Einsaatmenge.



#### 4. Diskussion

Für die Kurzzeitpasteurisierung der Milch ist für den Temperaturbereich von  $71 - 74^{\circ}\text{C}$  eine Mindestheißhaltezeit von 30 Sekunden vorgeschrieben. In der Praxis sind die Geräte erfahrungsgemäß so eingestellt, daß bei einer Temperatur von  $74^{\circ}\text{C}$  eine Durchlaufzeit der Milch von 40 Sekunden erreicht wird. Alle 59 Stämme der Arten *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.thamnopeos* und *M.vaccae* wurden sowohl bei  $71^{\circ}\text{C}$  als auch bei  $74^{\circ}\text{C}$  innerhalb der geforderten Mindestheißhaltezeit von 30 Sekunden mit Sicherheit abgetötet. Bei  $71^{\circ}\text{C}$  ließ sich nach einer Einwirkungszeit von 15 Sekunden, bei  $74^{\circ}\text{C}$  bereits nach 10 Sekunden in keinem Falle mehr Wachstum bei diesen Mykobakterienarten nachweisen. Stämme, die nach einer 5 - 10 Sekunden dauernden Erhitzung noch angingen, zeigten bereits bei dieser kurzen Einwirkungszeit gegenüber den mitgeführten Kontrollen ein sehr stark verzögertes und gehemmtes Wachstum.

Eine Ausnahme bildeten die untersuchten Stämme von *M.phlei*. Alle 10 Stämme überstanden eine 80 Sekunden dauernde Erhitzung auf  $71^{\circ}\text{C}$ . Allerdings konnte gewöhnlich ab 15 Sekunden auch hier schon eine deutliche Reduzierung der Koloniezahlen gegenüber den unerhitzten Kontrollen beobachtet werden (Ausnahme Stamm S 15). Diese partielle Wachstumshehmung war bei  $74^{\circ}\text{C}$  noch deutlicher ausgeprägt. Aber nur bei 2 der 10 untersuchten Stämme wurde innerhalb der vorgeschriebenen Mindestheißhaltezeit von 30 Sekunden eine Koloniebildung vollkommen verhindert. 4 Stämme überstanden sogar eine 60 - 80 Sekunden dauernde Einwirkung von  $74^{\circ}\text{C}$  und konnten selbst durch eine Erhitzung auf  $80^{\circ}\text{C}$  während 15 Sekunden nicht restlos inaktiviert werden. Die seit langem bekannte und

auch als Differenzierungsmerkmal verwendbare hohe Thermoresistenz von *M.phlei* (52) fand in unseren Untersuchungen damit erneut eine eindeutige Bestätigung. *M.phlei* scheint daher die bisher einzige bekannte Spezies zu sein, deren Abtötung auch durch eine ordnungsgemäße Milchpasteurisierung in Frage gestellt sein könnte.

Es ist aber zu berücksichtigen, daß die Keimzahl der von uns im Kapillartest geprüften Suspensionen viel höher lag als dies unter natürlichen Verhältnissen in kontaminierter Milch überhaupt der Fall sein kann. Die Ausgangskeimzahl dürfte aber gerade bei der Pasteurisierung eine wichtige Rolle spielen. Die Untersuchungen von FINKBEINER (17) an *M.avium* hatten nämlich klar erkennen lassen, daß sich mit zunehmender Dichte der Keimsuspensionen die Abtötungszeiten im Kapillartest verlängerten. Außerdem spielt die Zusammensetzung des Mediums eine nicht unerhebliche Rolle. So fand FINKBEINER, daß die von ihm untersuchten Stämme in glycerinhaltigem Kirchner-Herrmann-Substrat eine höhere Hitzeresistenz zeigten als in Milch. Ich verwendete in meinen Untersuchungen ein glycerinhaltiges Tween-Medium. So gesehen braucht m.E. auch die hohe Thermoresistenz von *M.phlei* in meinen Laboruntersuchungen nicht überbewertet zu werden. Zudem liegen bisher keinerlei Anhaltspunkte oder Befunde dafür vor, daß infolge Genuß pasteurisierter Milch bei Menschen weder durch *M.phlei* noch durch andere schnellwachsende Mykobakterien Infektionen, die bei diesem Ansteckungsweg zwangsläufig im Halsbereich manifest werden müßten, vorgekommen sind. Vielmehr werden für das gelegentliche Auftreten von Mykobakteriosen der Halslymphknoten Schmierinfektionen verantwortlich gemacht (11).

Es ist bekannt, daß infolge der ubiquitären Verbreitung von atypischen Mykobakterien diese Keime relativ häufig auch in Rohmilch

vorkommen können (4, 8, 12, 25, 46). Besonders beim Melken und Umfüllen können schnellwachsende atypische Mykobakterien aus der unmittelbaren Umgebung des Tieres in die Milch gelangen (22). Die von mir durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß es in Milch, die mehrere Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird, durchaus zu einer Vermehrung von Mykobakterien kommen kann. Daß dabei die Stämme von *M.thermophilus* die beste Vermehrung zeigten, ist nicht verwunderlich. Es handelt sich bei dieser Art, die 1929 erstmals beschrieben wurde (1), um eine Kaltblüterspezies, die sich besonders im niedrigen Temperaturbereich gut vermehrt. Gute Vermehrung zeigte auch *M.vaccæ*, eine Spezies, die erfahrungsgemäß in Milch relativ häufig vorkommt (8). *M.diernhoferi*, wie *M.vaccæ* ebenfalls aus der Umgebung des Rindes isoliert, zeigte von allen untersuchten Stämmen die schlechteste Vermehrung.

Bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, daß für diese Laborversuche eine keimfreie Milch mit Mykobakterien beimpft wurde. Es ist nicht auszuschließen, daß die in der Rohmilch vorkommende Bakterienflora einen hemmenden Einfluß auf die Vermehrung von Mykobakterien hat. Bei ordnungsgemäßer Pasteurisierung wird aber eine große Zahl von Mykobakterien abgetötet, wie die von mir durchgeführten Thermoresistenzversuche gezeigt haben.

Für andere Bakterienarten können nach den Untersuchungen von TERPLAN et.al.(56) nicht gründlich gereinigte und desinfizierte Milchleitungen, Abfüllgeräte- und Vorrichtungen sowie auch Verpackungsmaterial als mögliche Kontaminationsquellen für pasteurisierte Milch in Frage kommen. Vielleicht erklären sich so auch die wenigen Fälle, in denen atypische Mykobakterien bisher aus pasteurisierter

Milch isoliert wurden. Hierbei wurden vielfach kulterell nur 1 - 2 Kolonien auf den Nährböden angezüchtet (4).

Zusammenfassend möchte ich aus meinen Befunden folgern, daß die Pasteurisierung mit dem Kurzzeit-Erhitzungsverfahren ausreichende Sicherheit für die Abtötung schnellwachsender Mykobakterien in Milch bietet und auch eine wirksame Maßnahme darstellt, um Mensch und Tier vor den in Rohmilch relativ häufig vorkommenden Mykobakterien zu schützen. Voraussetzung ist natürlich, daß die Pasteurisierungsapparate den Vorschriften entsprechend arbeiten und daß keine nachträgliche Kontamination mehr stattfindet.

Bei ordnungsgemäßer, d.h. gekühlter Lagerung, ist nicht mit einer Vermehrung zu rechnen. Eine gewisse Anreicherung dieser Keime dürfte lediglich in Milchrückständen, die sich in Rohrleitungen usw. befinden, möglich sein.

## 5. Zusammenfassung

1. a) Um die Wirkung der Pasteurisierung auf schnellwachsende atypische Mykobakterien zu untersuchen, wurden je 10 Stämme von *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.fortuitum*, *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.vaccae* und 9 Stämme von *M.thamnopheos* in tween-haltiger Glycerinbouillon in Glaskapillaren Temperaturen von 71° und 74°C über abgestufte Zeitspannen ausgesetzt.

b) Mit Ausnahme von *M.phlei* wurden alle 59 Stämme der untersuchten Mykobakterienarten innerhalb der Mindestheißhaltezeit von 30 Sekunden, die für die Kurzzeiterhitzung vorgeschrieben ist, bereits bei einer Temperatur von 71°C abgetötet.

Von *M.phlei* dagegen überlebten alle 10 Stämme die Erhitzung auf 71°C während 80 Sekunden, 8 Stämme auch eine Erhitzung auf 74°C während 30 Sekunden. Bei 80°C überstanden 2 Stämme von *M.phlei* noch eine 15 Sekunden dauernde Hitzeexposition. Die Erhitzung hatte allerdings stets eine erhebliche Reduktion der Keimzahl zur Folge.

2. a) An je 2 Stämmen von *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.phlei*, *M.thamnopheos* und *M.vaccae* wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen die Vermehrung in keimfreier Milch untersucht.

b) *M.phlei*, *M.thamnopheos* und *M.vaccae* zeigten vom ersten Tage an ein exponentielles Wachstum. Nach 3 Tagen wurde eine Vermehrung um den Faktor  $10^3$ , am 6. Tag um den Faktor  $10^5 - 10^6$  erreicht. Die Arten *M.borstelense* und *M.diernhoferi* wuchsen dagegen sehr langsam, bis zum 5. oder 6. Tag hatte sich die eingebrachte Keimmenge nur um das Hundertfache vermehrt.

3. Aus den Untersuchungsergebnissen wird geschlossen, daß in Rohmilch vorkommende schnellwachsende atypische Mykobakterien durch eine ordnungsgemäße Pasteurisierung (Kurzzeiterhitzung auf 71 bis 74°C) in der Regel abgetötet werden. Der Milch kann demnach für die Verbreitung von Mykobakterien der Gruppe IV nach RUNYON und das Auftreten von Mykobakteriosen keine erhebliche Bedeutung zugemessen werden.

## 5. Summary

1. a) To test the effect of pasteurization on rapidly growing atypical mycobacteria, 10 strains of *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.fortuitum*, *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.vaccae* and 9 strains of *M.thamnopheos* were suspended in Tween-glycerin-bouillon and exposed in glass capillaries to temperatures of  $71^{\circ}$  -  $74^{\circ}\text{C}$  for various lengths of time.

b) With the exception of *M.phlei* all 59 strains were killed within 30 seconds - the minimum time required for pasteurization of milk by law - at temperatures of  $71^{\circ}\text{C}$ .

All the 10 strains of *M.phlei* survived heating at  $71^{\circ}\text{C}$  for 80 seconds, and 9 of these strains survived temperatures of  $74^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds. An exposition to  $80^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds was survived by 2 strains of *M.phlei*. The heating was always followed by a considerable reduction in the number of living germs.

2. a) The growth of 2 strains each of *M.borstelense*, *M.diernhoferi*, *M.phlei*, *M.thamnopheos* and *M.vaccae* was tested over six days in milk kept at room temperature.

b) *M.phlei*, *M.thamnopheos* and *M.vaccae* showed an exponential growth from the first day on. The bacterial count increased in three days by the factor  $10^3$ , during six days by the factor  $10^5$  -  $10^6$ . *M. borstelense* and *M.diernhoferi* grew very slowly, after five or six days the bacterial count had increased by the factor 100.

3. It is concluded, that fast growing atypical mycobacteria, found in raw milk, will usually be killed by regular pasteurization (short time heating to  $71 - 74^{\circ}\text{C}$ ). The importance of milk to the dissemination of mycobacteria of the RUNYON group IV and the occurrence of mycobacterioses is considered to be very low.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aronson, J.D.                      Spontaneous tuberculosis in snakes  
N. Sp. Mycobacterium thamnophaeos  
J. inf. Dis. 44, 215 (1929)
2. Basenau, F.                        Über die Abtötung von Tuberkelbakterien  
durch Erhitzung  
Zbl. Bakt. I Orig. 53, 61 (1910)
3. Beerwerth, W.                      Zur Ökologie der Mykobakterien  
Schürmann, J.                        Zbl. Bakt. I Orig. 211, 58 (1969)
4. Beerwerth, W.                      Mykobakterien in der Milch  
Milchwiss. 25, (1970)    S.336
5. Bigelow                            zit. nach Gantz (19)
6. Bingel, K.F.                        Laboratoriumsverfahren zur Prüfung belie-  
biger Hitze-Zeit-Kombinationen unter Be-  
dingungen des Laboratoriumsexperimentes  
Zbl. Bakt. I Orig. 159, 110 (1952)
7. Bönicke, R.                        Derzeitiger Stand der Klassifizierung atypi-  
scher Mykobakterien mit biochemischen Metho-  
den  
Zeitschr. f. Tuberk. 127, 13 (1967)
8. Bönicke, R. und                    Beschreibung einer neuen Spezies:  
Juhasz, S.E.                        Mycobacterium vaccae  
Zbl. Bakt. I Orig. 192, 132 (1964)
9. Bönicke, R. und                    Über das Vorkommen von Kohlenhydrat-  
Kazda, J.                        Nitritreduktasen in schnellwachsenden Myco-  
bacteriumarten und ihre Bedeutung für die  
Differenzierung dieser Arten  
Zbl. Bakt. I Orig. 213, 68 (1970)

10. Brauer, A. Untersuchungen über das Vorkommen von Mykobakterien in der Milch von Kühen aus Beständen mit zweifelhaften Tuberkulinreaktionen nach Bekämpfung der Rindertuberkulose  
Vet. med. Diss. München 1968
11. Brehmer, W. Zur Bedeutung der aviären und sogenannten atypischen Mykobakterien in der Humanmedizin  
2. Sympos. u. Lebensmittelmikrobiol. der DVG in Berlin, 1 - 13 (1970)
12. Chapman, J.S.  
Bernard, J.S.  
Speight, M. Isolation of Mycobacteria from raw milk  
Amer. Rev. resp. Dis. 91, 351 (1965)
13. Chapman, J.S.  
Speight, M. Isolation of atypical mycobacteria from pasteurized milk  
Amer. Rev. resp. Dis. 98, 1052 (1968)
14. Dedie, K. Beitrag zur Epizootologie der Listeriose  
Arch. exper. Vet. med. 9, 251 (1955)
15. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie Richtlinien für die Prüfung von chem. Desinfektionsmitteln  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1969
16. Etmer, F.  
Lundt, P.V. Deutsche Seuchengesetze, Band II  
Stand: April 1972
17. Finkbeiner, H. Untersuchungen über die Thermoresistenz von Mycobacterium avium  
Vet. med. Diss. München 1966
18. Forster, N.N. Über die Abtötung von Tuberkelbakterien durch Erhitzung  
Zbl. Bakt. I Orig. 51, 417 (1909)
19. Gantz, H. Wege zur Verbesserung der Milchentkeimung  
Kieler Milchwirtschaftl. Forsch. Ber. 11, 1 (1959)

20. Gröll, F. Untersuchungen über hitzeresistente  
Tuberkelbakterienstämme  
Vet. med. Diss. Gießen 1951
21. Haag, F.E. Die saprophytischen Mykobakterien  
Zbl. Bakt. II Orig. 71, 1 (1927)
22. Hellmann, E. Zur Bedeutung der oviären und sogenannten  
atypischen Mykobakterien in der Veterinär-  
medizin unter besonderer Berücksichtigung  
lebensmittelhygienischer Aspekte  
2. Sympos. über Lebensmittelmikrobiol. der  
DVG in Berlin 26-40 (1970)
23. Herzer, H. Untersuchungen über die Hitzeresistenz  
von 44 bovinen Tuberkelbakterienstämmen  
gegen 75 bis 76 Grad Temperatur in Milch  
Lebensmitteltierarzt 1, 152 (1950)
24. Hilburg, H. Der derzeitige Stand der Milcherhitzungs-  
technik in Westdeutschland  
Arch. Lebensmittelhyg. 6, 141 (1955)
25. Jones, F.J.  
Jenkins, E.E.  
Lee, K.H.K. Raw milk as a source of mycobacteria  
Canad. Journ. Microbiol. 12, 79 (1966)
26. de Jong, B.A. Pasteurisierung der Milch in Bezug auf  
Abtötung von Tuberkelbacillen  
Zbl. Bakt. I Orig. 48, 670 (1909)
27. Kozak, J. Mykobakterien im Trinkwasser als Ursache  
der Parallerergie gegenüber Tuberkulinen  
bei Tieren. III. Mitteilung:  
Taxonomische Studie einiger raschwachsen-  
der Mykobakterien und Beschreibung einer  
neuen Art: M.brunense n.sp.  
Zbl. Bak. I Orig. 263, 199 (1967)
28. Kielwein, G. Pers. Mitt. 1971

29. Lampe, B. Die Zuverlässigkeit der Milchpasteurisierung  
Arch. Lebensmittelhyg. 6, 25 (1955)
30. Larmola, E. Über die Hitzeempfindlichkeit der Tuberkelbacillen  
Zbl. Bakt. I Orig. 151, 48 (1944/45)
31. Lembke, K.F. zit. nach Gantz (19)
32. Lerche, M. Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung  
Verlag Paul Parey 1966
33. Meissner, G. Bakteriologische und biochemische Differenzierung von atypischen Mykobakterien  
2. Sympos. ü. Lebensmittelmikrobiol. der DVG in Berlin 88 - 109 (1970)
34. Meyn, A. Stöffler, H. Zur Kenntnis und Systematik der in der Milch vorkommenden Mykobakterien  
Milchwiss. 6, 15 (1951)
35. Meyn, A. Schliesser, Th. Untersuchungen über das Vorkommen von Mykobakterien in den Darmlymphknoten von Schlachtschweinen  
Mh. Vet. Med. 17, 49 (1962)
36. Nassal, J. Englert, K. Zur Ätiologie und Histologie isolierter, sog. tuberkuloseähnlicher Veränderungen in den Lymphknoten des Schweines  
Mh. prakt. Tierheilk. 15, 225 (1963)
37. Naylor, P.F. A presumptive Test for the Detection of Mycobacterium smegmatis in Milk  
Res. vet. Sci. (1972) 13, 93
38. Petersen, K.J. Mycobacterium fortuitum as a Cause of Bovine Mastitis: Tuberculine Sensitivity following experimental Infections  
J. A. V. M. A. 147, 1600 (1965)



51. van der Sluis, Y.      Über die Abtötung der Tuberkelbazillen  
in natürlich infizierter Milch und über  
die Pasteurisierung der Milch  
Diss. Bern 1909
52. Staudacher, G.      Untersuchungen zur Diagnostik schnell-  
wachsender atypischer Mykobakterien  
Vet. med. Diss. München 1970
53. Stoll, L.  
Siam, M.A.      Zur bakteriologischen Differentialdiag-  
nostik der isolierten Lymphknotentuber-  
kulose des Schweines unter Berücksichti-  
gung des Vorkommens atypischer Mykobakte-  
rien  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 75, 395 (1968)
54. Stuart, P.  
Harvey, P.      Bovine mastitis resembling tuberculosis  
caused by mycobacterium lacticola and  
other rapidly growing acid-fast bacteria  
Vet. Rec. 63, 881 (1951)
55. Stur, D.      Über die Thermoresistenz der Tuberkel-  
bakterien (Vortrag)  
Zbl. Bakt. I Ref. 169, 389 (1958)
56. Terplan, G.  
Wiesner, H.U.      Zur mikrobiologischen Qualität der Trink-  
milch 1. Mitteilung: Lose und abgepackte  
Milch im Einzelhandel  
Arch. Lebensmittelhyg. 21, 73 (1970)
57. Tucker, E.W.      Infection of the Bovine Udder with  
Mycobacterium species  
Cornell Vet. 43, 576 (1953)
58. Unertl, B.      Untersuchungen über das Vorkommen von  
Mykobakterien in Rohmilch  
Vet. Med. Diss. München 1970

59. Wiesner, H.U.  
Reverey, Ch. P.  
Terplan, G.

Zur mikrobiologischen Qualität der Trinkmilch. 4. Mitteilung: Einfluß der Abfülleinrichtungen beim Milchhandel

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 86 (1971)

60. Wilson, C.D.

Reducing the Incidence of Udder Infections in Dry Cows

Vet. Rec. 79, 374 (1966)



Herrn Professor Dr. Th. Schliesser möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte Unterstützung sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Weber für die zahlreichen Anregungen und für die vielen wertvollen Ratschläge.

Die sorgfältige Erstellung der fotografischen Abbildungen verdanke ich Fräulein I.-M. Schultze.



## 7. Lebenslauf

Am 5. Oktober 1943 wurde ich in Bad Hersfeld geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich in Braunhausen,  
Krs. Rotenburg/Fulda, die Grundschule, von 1954 bis  
1956 die Alte Klosterschule in Bad Hersfeld, von 1956  
bis 1963 die Wöhlerschule in Frankfurt/M., an der ich  
im Februar 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1.4.1963 bis zum 31.3.1967 leistete ich freiwilligen  
Wehrdienst als Soldat auf Zeit in der Bundesmarine.

Im April 1967 begann ich an der Justus Liebig-Universität  
das Studium der Veterinärmedizin und schloß es am  
3. Juli 1972 mit der Tierärztlichen Prüfung ab.

Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation habe ich  
im Juli 1970 aufgenommen und sie im August 1972 beendet.

Am 1. Januar 1990 wurde das in der ersten Fassung  
des Gesetzes vom 19. März 1989 erlassene  
Gesetz über die Einmündigkeit der Jugendlichen  
und die Volljährigkeit der Jugendlichen und  
die Volljährigkeit der Jugendlichen in der  
Fassung vom 1. Januar 1990 geändert.

Am 1. April 1991 wurde das Gesetz über die  
Einmündigkeit der Jugendlichen und die  
Volljährigkeit der Jugendlichen in der  
Fassung vom 1. Januar 1990 geändert.

Am 1. Januar 1992 wurde das Gesetz über die  
Einmündigkeit der Jugendlichen und die  
Volljährigkeit der Jugendlichen in der  
Fassung vom 1. Januar 1991 geändert.

Am 1. Januar 1993 wurde das Gesetz über die  
Einmündigkeit der Jugendlichen und die  
Volljährigkeit der Jugendlichen in der  
Fassung vom 1. Januar 1992 geändert.



